

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar  
Biológia Doktori Iskola  
Kísérletes Növénybiológia doktori program

**Vajna Balázs**

**A bakteriális közösségek változásának jellemzése  
molekuláris módszerekkel a laskagomba-alapanyag  
gyártása során:**

**A T-RFLP adatfeldolgozás optimalizálása és alkalmazása**

*– doktori értekezés tézisei –*

*Témavezető:*

**Márialigeti Károly**  
(ELTE Mikrobiológiai Tanszék)

*Biológia Doktori Iskola vezetője:*

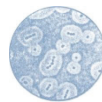
**Dr. Erdei Anna**  
tanszékvezető egyetemi tanár  
(ELTE Immunológiai Tanszék)

*Kísérletes Növénybiológia doktori program vezetője:*

**Dr. Szigeti Zoltán**  
tanszékvezető egyetemi tanár  
(ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék)



Készült az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékén 2010-ben.



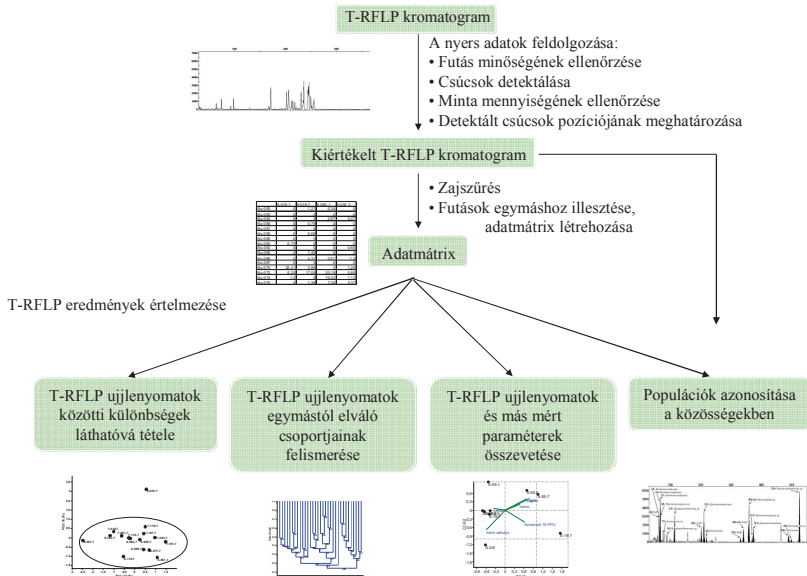
## Bevezetés

A baktérium közösségek szerepének és működésének jobb megértéséhez alapvető feltétel a közösségek összetételének leírása. Hagyományosan ezt a (környezeti) mintákból való tenyészetek készítésével oldják meg, amelynek során tiszta tenyészeteket állítanak elő. Ezekre a módszerekre ma is szükség van, hiszen így lehetséges az egyes baktériumok pontosabb megismerése, leírása. A mai mikrobiális ökológia egyik fő problémája azonban a „tenyésztésbe nem vonható” baktériumok kérdése. Vagyis az, hogy a korábbi eljárások csak a „mikrobiális jéghegy” csúcsát mutatják ki. A molekuláris technikák ugyanakkor új lehetőségeket nyitnak a mikrobiális sokféleség, a „csendes többség” diverzitásának a feltárásában.

A molekuláris módszerek egyrészt a teljes baktérium sejtet (pl.: fluoreszcens in situ hibridizáció), másrészt a mintákból kivont, a mikroba-közösségekre jellemző vegyületeket, elsősorban nukleinsavakat (DNS és RNS), zsírsavakat, kinonokat használják fel a baktériumok diverzitásának a vizsgálatára. A bakteriális genom közösségi elemzés során leggyakrabban vizsgált része a 16S rDNS régió. Részletes elemzését klónkönyvtárak vizsgálata segítségével végzik el. Nagyszámú minta esetében ez meglehetősen költség- és időigényes, így az elmúlt évtizedben számos közösségi ujjlenyomat vizsgáló módszer terjedt el, mint a DGGE (denaturáló grádiens gélelektroforézis), a RISA (ribosomal RNA intergenic spacer analysis; riboszomális RNS intergénikus szakaszainak elemzése), az SSCP (single strand conformation polymorphism; egyszálú DNS konformációs polimorfizmusa) és a T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; hasított darabok terminális hossz-polimorfizmusa). Ezek közül a T-RFLP pontosságával, reprodukálhatóságával és nagy felbontásával tűnik ki.

A T-RFLP vizsgálatokat két fő szakaszra lehet bontani. Az első szakasz a T-RFLP ujjlenyomat létrehozása, mely 3 részből áll. (1) Az izolált DNS megfelelő szakaszait 5' végén fluoreszcensen jelölt PCR-primerekkel felszaporítják. Így az egyik végükön jelölt PCR-termékek jönnek létre. (2) Ezeket restriktációs endonukleáz enzimekkel emésztik, ami által különböző méretű jelölt – ez a hasított szakaszok terminális része, a T-RF (Terminal Restriction Fragment) – és jelöletlen DNS szakaszok (fragmentumok) keletkeznek. A reakcióelegyet ezután tisztítják (például etanolos kicsapással). (3) Végül a jelölt és jelöletlen DNS-fragmentumokat nagy felbontású kapilláris gélelektroforézis segítségével választják el, és közülük a jelölt szakaszokat (T-RF-ek) a fluoreszcens jelölés alapján lézerfény segítségével detektálják. A detektálás során keletkezik a T-RFLP kromatogram. A vizsgálat második szakasza az eredmények – a feldolgozatlan T-RFLP kromatogram – adatfeldolgozása, értelmezése (1. ábra).

A T-RFLP eredmények adatfeldolgozása az adatmátrix elkészítéséig



1. ábra: A T-RFLP eredmények adatfeldolgozásának, értelmezésének főbb lépései.

A módszert alkalmazók azonban sokszor nem rendelkeznek megfelelő technikai háttérismerettel, elsősorban az adatfeldolgozás terén. Munkánk során ezért az ELTE Mikrobiológiai Tanszéken már hosszabb ideje használt T-RFLP módszert vizsgáltuk meg részletesen, és használtuk fel a laskagomba alapanyag-gyártás baktériumközösségének monitorozására.

A laskagomba (*Pleurotus* spp.) a csiperke után a második legnagyobb mennyiségben termelt gomba Magyarországon. Annak ellenére, hogy a laskagombát már régóta termesztik, nem rendelkezünk elégséges tudással az alapanyag mikrobiotájáról, amely az alapanyag minőségének fontos paramétere. A komposztálás során végbemenő mikrobiológiai szukcessziót már régóta tanulmányozzák, de ez jelentősen eltér a gyorsabb és szabályozottabb, részleges komposztáláson, pasztörizáláson és kondicionáláson alapuló gombatermesztéstől.

## Célkitűzések

Dolgozatunk első részében a következő célokat kívántuk elérni:

1. A T-RFLP adatfeldolgozás optimalizálása, amely a következő lépések megvizsgálását foglalja magában:
  - a. Meghatározni azon kritériumokat, amelyek teljesülése esetén egy T-RFLP futás alkalmas a további elemzésekre.
  - b. Elemezni azt, hogy szükség van-e párhuzamos futások adatainak feldolgozására, vagy elegendő minden mintából egy futás adatainak felhasználása.
  - c. Megjelölni a zajsűrűséhez megfelelő módszer kiválasztásának elveit, ennek alapján lehet eldönteni, hogy mikor minősül egy csúcs zajnak, vagy valódi csúcsnak.
  - d. Optimalálni az egyes T-RFLP futások adatainak egymáshoz illesztését és az adatmátrix létrehozását, vagyis azt a folyamatot, hogy hogyan lehet megtalálni az egymásnak megfelelő csúcsokat két különböző futásban.
  - e. Értelmezni az egyes futások közötti, adatmátrixban „kódolt” különbségeket. Bemutatni a különbségeket okozó domináns T-RF-ek megtalálásának eljárását.
2. Az optimalizálás nyomán leírni egy standardizált T-RFLP adatfeldolgozási protokollt. Ennek tartalmaznia kell minden lépés esetén az ajánlott módszert, illetve jeleznie kell, hogy milyen esetekben kell esetleg más eljárást választani. A protokoll segítségével a jövőben szilárdabb tudományos alapon használható a T-RFLP mikrobiális ökológiai vizsgálatokban.

Dolgozatunk második részében a laskagomba-alapanyag gyártás mikrobiológiai vonatkozásait vizsgáltuk meg a következő célokat kitűzve:

3. A standardizált T-RFLP adatfeldolgozási protokoll segítségével a laskagomba alapanyag baktériumközösségének megvizsgálása, a gyártás során benne végbemenő változások feltárása.
4. A kész alapanyag mikrobiális és fizikai-kémiai tulajdonságai, illetve az adott alapanyagon később termelt laskagomba mennyisége közötti összefüggések feltárása.
5. Az egyes alapanyaggyártási fázisokra jellemző domináns baktériumok azonosítása T-RFLP és klónkönyvtárak segítségével.

## Az alkalmazott módszerek

Az általunk vizsgált laskagomba alapanyagot búzaszalma részleges komposztálásával a Pilze-Nagy Kft. állította elő. Munkánk során a 2006-2008-as években 16 alapanyag-gyártási sorból vettünk 3-3 ponton mintát: (1. fázis) aprított, nedvesített szalma a gyártás kezdetekor; (3. fázis) alapanyag a halomkomposztálás végén, az alagútba töltés előtt; (7. fázis) kész alapanyag az alagútból való kitároláskor, a becsíráztatás előtt. A kész alapanyag (7. fázis) kémhatását, N-, nedvesség- és hamutartalmát egy akkreditált laboratórium (Bács-ÁG Kft.), míg az adott alapanyagon később termett laskagomba mennyiségét a termeszető cég munkatársai határozták meg.

Munkánk során a baktérium közösséget 16S rDNS szekvencia alapon molekuláris technikákkal vizsgáltuk. A mintákból a DNS-t folyékony nitrogénnel fizikai úton tártuk fel, majd a nyers lízátum tisztításához szilikagél alapú módszert használtunk. A bakteriális 16S rDNS régió első szakaszát HEX-27F (fluoreszcensen jelölt) – 534R primer alkalmazásával szaporítottuk fel a PCR során. A termékeket *AluI* és *Hin6I* restrikciós enzimekkel emésztettük, majd etanolos kicsapással tisztítottuk, végül kapilláris elektroforézissel választottuk el, és a fluoreszcensen jelölt fragmentumokat lézertűny segítségével detektáltuk.

A T-RFLP kromatogramok feldolgozását a GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems) programok Microsatellite módszerével, a zajszűrést a T-REX online T-RFLP adatfeldolgozó programmal végeztük. Az egyes futások egymáshoz illesztéséhez a T-REX programba beépített legközelebbi egész számra való kerekítést és T-Align modult, illetve az R programban írt parancssort használtuk. Az optimális binek meghatározásához, vagyis ahhoz, hogy két egymást követő T-RF csúcs mikor tartozzon azonos kategóriába, a párhuzamos futások azonos csúcsai között megfigyelt eltérések nagyságát (T-RF drift) használtuk fel, amit Excel programban számoltunk ki. Az illesztés során az egyes csúcsok nagyságát a programok standardizálták a görbe alatti terület, vagyis az összfluoreszcencia segítségével. A továbbiakban a két restrikciós enzimmel (*AluI* és *Hin6I*) kapott mátrixot a robosztusabb eredmény érdekében együttesen kezeltük.

A T-RFLP adatfeldolgozás során kapott adatmátrixok értelmezését (ordinációk és dendrogramok) és statisztikai vizsgálatát Past és R programmal végeztük. Kiszámoltuk az egyes minták diverzitását (Shannon és Simpson-index alapján), és box-plotot készítettünk ezekre az értékekre meghatározva a diverzitás alapján kilógó mintákat. Az egyes mintacsoportok szignifikáns különválását ANOSIM módszerekkel teszteltük, míg az elválást leginkább befolyásoló csúcsokat SIMPER módszerrel határoztuk meg. A különböző módszerekkel kapott ordinációkat Prokrusztész-analízissel hasonlítottuk össze a GenStat for Windows programot használva.

A kanonikus elemzések során a minták első főkomponenseken felvett koordinátái és a fizikai-kémiai paraméterek illetve terméshozamok között Past programmal számoltunk lineáris korrelációt, és határoztuk meg, hogy az adott érték szignifikáns mértékű-e. Elemzésünket kiegészítettük, az R program „envfit” parancsával is, mely a már elkészült PCA ordinációra vetíti vektorként a környezeti paramétereket, majd ezen illeszkedés korrelációs koefficiensét és – random permutációk segítségével – szignifikancia szintjét határozza meg.

Mivel a T-RFLP technika nem alkalmas közvetlen fajazonosításra, ezért egy gyártási sor három mintájából és még 3 kész alapanyagból klónkönyvtárakat hoztunk létre. Ehhez a 16S rDNS régió közösségi T-RFLP-hez is felhasznált első szakaszát alkalmaztuk. Elvégeztük a klónok T-RFLP analizisét, és a hasítási helyeknek megfelelően csoportosítottuk őket. Kiválasztottuk az olyan hasítási hellyel rendelkező klóncsoportokat, amelyek megfeleltethetők voltak közösségi T-RFLP kromatogramokon az egyes fázisokra, illetve a 7. fázis esetén azon belüli csoportokra jellemző domináns csúcsoknak. Majd elvégeztük a kiválasztott klóncsoportok egy-egy reprezentáns tagjának bázissorrend elemzését. A kromatogramokat a Chromas program segítségével manuálisan korrigáltuk, az esetleges kiméra szekvenciákat a Mallard program segítségével találtuk meg, majd eltávolítottuk őket. A szekvenciákat a Blast programmal a Genbank DNS-adatbázissal, illetve a prokarióta típusú törzseket tartalmazó EzTaxon adatbázissal vetettük össze.

## Az értekezés eredményei és a következtetések

Munkánk első részében optimalizáltuk a T-RFLP adatfeldolgozás lépéseit, és ezt az optimalizált protokollt alkalmaztuk a laskagomba alapanyag-gyártás baktériumközösségének vizsgálatára. Majd megvizsgáltuk, hogy van-e szignifikáns összefüggés a T-RFLP eredmények és a kémiai háttérváltozók értékei illetve a laskagomba terméshozama között. Végül klónkönyvtárak segítségével jellemeztük az egyes fázisok és kiemelten a kész alapanyag baktériumközösségének összetételét.

### Az optimalizált T-RFLP adatfeldolgozás leírása

Az előző fejezetekben bemutatott módszert az alábbi pontokban lehet röviden összefoglalni:

- 1) Első lépés a **megfelelő futások kiválasztása** volt. A GeneMapper program automatikusan ellenőrizte a T-RFLP futások minőségét, és csak a program által megfelelőeket fogadtuk el. Majd manuálisan végignéztük a futásokat, de a program által detektált csúcsokon csak akkor változtattunk, ha a főbb csúcsoknál találtunk szembeötlő hibát. A kiértékelés során csak a 35 bp-nál hosszabb fragmentumokat

vettük figyelembe, és megtartottuk az 500 bp-nál hosszabbakat is. Végül egy futást csak akkor fogadtunk el megfelelőnek, ha nem tartalmazott „offscale” csúcsot, de az összfluoreszcencia elérte a legalább 100.000 RFU értéket. Ezeket a futásokat feltöltöttük a T-REX online T-RFLP adatfeldolgozó programba. Majd ott végeztük a futások zajszűrését és egymáshoz való illesztését.

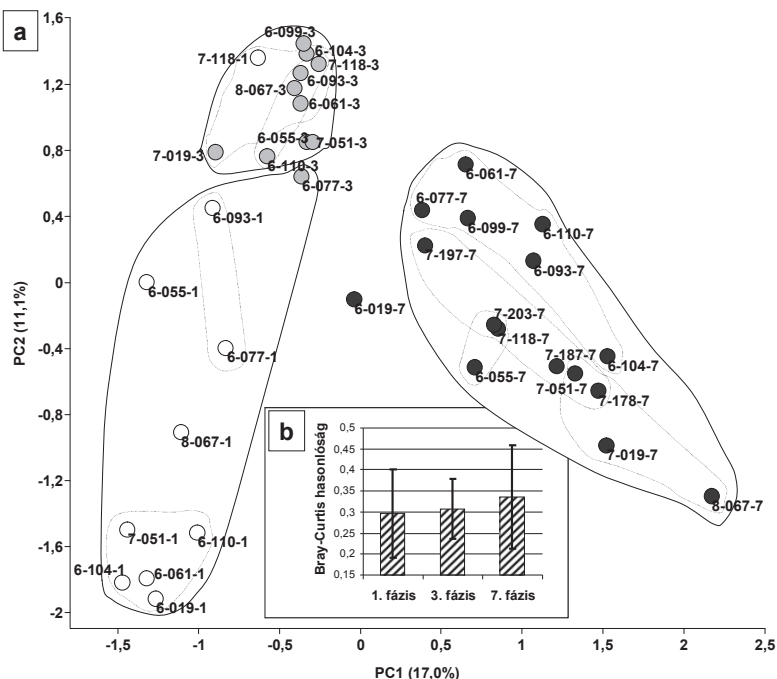
- 2) Mivel minden mintából csak egy futást használtunk fel a vizsgálatokhoz – elsősorban költséghatékonyság és időtakarékoság miatt –, csökkenteni kellett azt a hibát, amit **egy minta párhuzamos futásai** közötti variancia elhanyagolása okozott. Emiatt mintánként egybevtünk az *AluI* és *Hin6I* enzimekkel emésztett PCR termékek futásadatait. Majd a párhuzamos futások közti varianciák alapján meghatároztuk az egyes T-RF méreteknél, az egyes enzimek esetén alkalmazott binek értékeit. Ezek az értékek közvetlenül is felhasználhatóak más minták esetén, vagy az itt leírt módon kell meghatározni a binek értékeit.
- 3) A **zajszűrés**hez összehasonlítottuk az *arányos küszöbérték* és a *küszöbérték statisztikai meghatározása* módszereket. A konkrét zajszűrés paraméter megállapításához figyelembe vettük, hogy a párhuzamos futásoknál általában csak a 0,2%-os relatív területnél nagyobb csúcsok találhatók meg valamennyi futásban, vagyis a kisebb csúcsok zajnak tekinthetők. Végül a T-REX programba kisebb módosítással beépített *küszöbérték statisztikai meghatározása* módszert választottuk, 4 SD küszöbértékkel.
- 4) A T-RFLP futások egymáshoz **illesztését** szintén a T-REX programmal végeztük a beépített módosított T-Align modullal a párhuzamos futások vizsgálata során meghatározott változó binekkel. Mivel a T-REX nem alkalmas közvetlenül változó binek használatára, először külön-külön elvégeztük az illesztést valamennyi binnel, majd egyesítettük a megfelelő részeket az illesztésekből. Végül az *AluI* és *Hin6I* enzimekkel emésztett PCR termékek futásadataiból így összerakott két mátrixot egybevtünk.
- 5) Az így elkészült mátrixok alapján **a minták közötti különbségeket** főkomponens elemzéssel (PCA) **tettük láthatóvá**. A nagyon kis Shannon- és Simpson-diverzitással rendelkező minták torzítják az elkészülő ordinációt vagy fát, így érdemes őket kizárni az ábrázolásból. A megfelelő ordinációs módszer kiválasztásában segítségünkre volt az illesztési mátrix béta-diverzitásának meghatározása dCA és heterogenitás-számolás segítségével. Végül az ordináció értelmezését Bray-Curtis hasonlóság alapján történő UPGMA csoportosítással és SIMPER elemzéssel, valamint a  $\text{Simper}_{50}$  csúcsok klónkönyvtárak segítségével történő azonosításával egészítettük ki.

A fentebb vázolt protokoll közvetlenül alkalmazható más minták esetében is, vagy a felhasznált döntési mechanizmusok útján kialakítható az adott mintához még megfelelőbb protokoll. A protokoll segítségével a jövőben szilárdabb tudományos alapon használható a T-RFLP mikrobiális ökológiai vizsgálatokban.

Az eredmények összegzése és továbblépési lehetőségek a laskagomba-alapanyag gyártás baktériumközösségeinek elemzése kapcsán

- A megalkotott T-RFLP adatfeldolgozási protokollt sikeresen alkalmaztuk a laskagomba alapanyag-gyártás teljes adatsorára. A protokoll tehát a célnak megfelelő. Továbbiakban érdemes lesz más típusú mintákra is alkalmazni, ahol például kisebb a diverzitás, kevesebb a domináns T-RF, nincs ilyen jól látható szukcesszió.
- Kimutattuk, hogy a laskagomba alapanyag-gyártás baktériumközössége egy jól nyomon követhető szukcessziós útvonalat jár be. Ez más komposztálási rendszerekből már ismert, a csiperketermesztést megalapozó komposztálásánál is kimutatták, de laskagomba esetén ilyen részletességgel még nem írták le. A főkomponens-elemzés ábráin vizuálisan jól követhető változás tényét az egyes fázisok közti szignifikáns eltéréssel támasztottuk alá (2. ábra).
- Megállapítottuk, hogy az időben egymás után gyártott kész alapanyagoknak a mikróbaösszetétele is közelebb áll egymáshoz. Ezt azzal a hipotézissel tudtuk megmagyarázni, hogy az alagútban – bár az egyes gyártási sorok között tisztítják és fertőtlenítik – fennmaradhatnak spórás, illetve termofil szervezetek, melyek mennyisége és összetétele folyamatosan változik, és amik újra és újra beolthatják az alagútba érkező alapanyagot. De a hipotézis alátámasztására a továbbiakban meg kell vizsgálni a kitisztított és fertőtlenített alagút mikrobiotáját.
- Nem találtunk összefüggést a kész alapanyag bakteriális ujjlenyomata és a vizsgált fizikai-kémiai jellemzői, illetve az adott alapanyagon később termelt laskagomba mennyisége között. Ennek hátterében számos ok húzódhat, de az egyik legfontosabb a statisztikai szempontból csekély mintaszám. Ennek ellenére a kanonikus elemzésekkel bemutattuk, hogy milyen módon lehet PCA és korrelációs elemzések segítségével T-RFLP ujjlenyomatokat és más környezeti adatokat összehasonlítani.





2. ábra: (a) A laskagomba alapanyag-gyártás bakteriális T-RFLP ujjlenyomatainak összehasonlítása főkomponens analízissel. A folytonos és a pontvonalak a Bray-Curtis hasonlóságon alapuló UPGMA fán alkotott csoportokat jelölik. A folytonos vonallal körbevett minták egymáshoz való Bray-Curtis hasonlósága meghaladja a 20%-ot, a pontvonalal körbevetté 35% feletti. Jelölések: fehér – 1. fázis; szürke – 3. fázis; fekete – 7. fázis. (b) Az egyes fázisokon belüli átlagos Bray-Curtis hasonlóság. A hibásávok az átlag±szórás értéket jelölik.

- Klónkönyvtárak segítségével sikerült a domináns T-RF-ek nagy részét azonosítani, és legközelebbi rokonaikat meghatározni. Az alapanyag-gyártás elejére az általános elterjedésű mezofil baktériumok jellemzőek. A halomkomposztálás végére más komposztálási rendszerek termofil fázisából már ismert mikrobióta alakul ki, amelynek domináns tagjai a termofil *Bacillus* és rokon nemzetségei valamint a *Pseudoxanthomonas* fajok. Míg a kész alapanyag domináns klónjainak nagy része az aktinobaktériumok, a *Thermus* nemzetség és a Firmicutes taxon tagjai közé sorolható.
- A kész alapanyagból készült mind a négy klónkönyvtárban jelen voltak a domináns csoportok, bár nem mindig ugyanazon fajok rokonait találtuk meg. Ez részben igazolja a

funkcionális redundanciát, amely szerint egy adott közösségi funkciót több különböző – jelen esetben rokon –, baktérium is elláthat.

- Az alapanyag-gyártás során folyamatosan nőtt a közeli rokon leírt fajokkal nem rendelkező baktériumklónok aránya. Így érdemes lenne a kész komposztból, ill. alapanyagból baktérium törzsgyűjteményeket létrehozni, hogy a tudomány számára még ismeretlen baktériumokat részletesen meg lehessen vizsgálni.
- A továbbiakban azt is fontos lesz megvizsgálni, hogy a munkánk során megismert baktériumközösség hogyan változik meg a termesztés további részében, az alapanyagnak laskagombával való átszővetése és a termőtestképzés során.

## **A tézisek alapjául szolgáló közlemények**

### **Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek:**

- Székely, A., J., Sipos, R., Berta, B., **Vajna, B.**, Hajdú, C., Márialigeti, K. 2009. DGGE and T-RFLP Analysis of Bacterial Succession during Mushroom Compost Production and Sequence-aided T-RFLP Profile of Mature Compost. *Microbial Ecology* 57, 522-33.
- Vajna, B.**, Nagy, A., Sajben, E., Manczinger, L., Szijártó, N., Kádár, Zs., Bordás, D., Márialigeti, K. 2010. Microbial community structure changes during oyster mushroom substrate preparation. *Applied Microbiology Biotechnology* 86, 367-375.

### **Fontosabb konferencia előadások:**

- Vajna, B.**, Szili, D., Nagy, A., Márialigeti, K. 2008. Characterization of bacterial community changes during oyster mushroom substrate production. The 6th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, September 29. - October 3. 2008, Bonn, Germany, Book of Abstracts 52.

## **Egyéb publikációk**

### **Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek:**

- Kovács, G., G., László, L., Bakos, A., Minarovits, J., Bishop, M., Ströbel, T., Mitrova, E., **Vajna, B.**, Majtényi, K. 2005. Increased incidence of genetic human prion disease in Hungary. *Neurology* 65, 1666-1669.

- Mezei, M., Balog, K., Babic, D., Z., Toth, G., Cech, G., **Vajna, B.**, Tauber, T., Seme, K., Tomazic, J., Vidmar, L., Poljak, M., Minarovits, J. 2006. Genetic variability of *gag* and *env* regions of HIV-1 strains circulating in Slovenia. *AIDS Research and Human Retroviruses* 22, 109-113.
- Borsodi, A., K., Makk, J., Ruzsnyák, A., **Vajna, B.**, Taba, Gy., Márialigeti, K. 2007. Phenotypic characterization and molecular taxonomic studies on *Bacillus* and related isolates from reed (*Phragmites australis*) periphyton. *Aquatic Botany* 86, 243-252.

**Fontosabb konferencia előadások:**

- Vajna, B.**, Marialigeti, K. 2005. Determining dry matter- and nitrogen-content of phase II *Agaricus bisporus* compost by NIR-technique, as an example of characterizing the quality of mushroom compost. *Acta Microbiologica et Immunologica*. 52, S169.
- Kanai, D., **Vajna, B.**, Márialigeti, K. 2009. Optimization of measuring cellulase and xylanase activity in oyster mushroom substrate. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 56, 42-43.